

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 03-007593

(43)Date of publication of application : 14.01.1991

(51)Int.Cl.

C12P 19/60

A23L 1/30

A61K 7/00

A61K 31/70

C07H 17/07

(21)Application number : 01-141902

(71)Applicant : HAYASHIBARA BIOCHEM LAB INC

(22)Date of filing : 03.06.1989

(72)Inventor : TSUCHIYA HIROMI  
MIYAKE TOSHIO

## (54) ALPHA-GLYCOSYL HESPERIDIN, PRODUCTION AND USE THEREOF

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain  $\alpha$ -glycosyl hesperidin having excellent water solubility and excellent physiological activity free from toxicity industrially and advantageously by linking  $\geq$  equimolar amount of D-glucose residue to hesperidin by  $\alpha$  bond.

CONSTITUTION: Hesperidin is dissolved in a solution having pH  $\geq$ 7.0 so as to make 0.01-10.0w/v% and blended with 0.5-50 times as much  $\alpha$ -glucosyl saccharide compound such as dextrin as hesperidin to give a blended solution. Then the blended solution is mixed with a glycosyltransferase derived from *Bacillus stearothermophilus* and reacted at pH7.5-10.0 at 50-80° C for about 24 hours to give a reaction solution. Then the reaction solution is heated, filtered to remove insoluble substances, the resulting substance is brought into contact with a porous synthetic adsorbent comprising nonionic styrene-divinylbenzene polymer and purified to collect  $\alpha$ -glycosyl hesperidin. Then the hesperidin is contained as an active ingredient to give an drug for alleviating sensitivity diseases or cosmetic.

## ⑫ 公開特許公報(A) 平3-7593

⑬ Int. Cl.<sup>9</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成3年(1991)1月14日

C 12 P 19/60

A 23 L 1/30

A 61 K 7/00

C 07 H 31/70  
17/07

ABF

Z  
F  
X

8214-4B

8114-4B

8413-4C

8413-4C

7431-4C

7822-4C

審査請求 未請求 請求項の数 6 (全14頁)

⑭ 発明の名称  $\alpha$ -グリコシル ヘスベリジンとその製造方法並びに用途

⑮ 特 願 平1-141902

⑯ 出 願 平1(1989)6月3日

⑰ 発 明 者 土 屋 裕 美 岡山県岡山市小山90番地の2

⑱ 発 明 者 三 宅 俊 雄 岡山県岡山市奥田1丁目7番10-403号

⑲ 出 願 人 株式会社林原生物化学 岡山県岡山市下石井1丁目2番3号  
研究所

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

 $\alpha$ -グリコシル ヘスベリジンとその製造方法  
並びに用途

## 2. 特許請求の範囲

(1) ヘスベリジンにD-グルコース残基が等モル  
以上 $\alpha$ 結合している $\alpha$ -グリコシル ヘスベリ  
ジン。(2) ヘスベリジンと $\alpha$ -グルコシル糖化合物とを  
含有する溶液に糖転移酵素を作用させて $\alpha$ -グ  
リコシル ヘスベリジンを生成せしめ、これを  
採取することを特徴とする $\alpha$ -グリコシル ヘ  
スベリジンの製造方法。(3) ヘスベリジンと $\alpha$ -グルコシル糖化合物とを  
含有する溶液に糖転移酵素を作用させて $\alpha$ -グ  
リコシル ヘスベリジンを生成せしめ、次いで、  
この溶液を多孔性合成吸着剤に接触させて精製  
し、 $\alpha$ -グリコシル ヘスベリジンを採取する  
ことを特徴とする $\alpha$ -グリコシル ヘスベリジ  
ンの製造方法。(4) ヘスベリジンにD-グルコース残基が等モル  
以上 $\alpha$ 結合している $\alpha$ -グリコシル ヘスベリ  
ジンを含有せしめた飲食物。(5) ヘスベリジンにD-グルコース残基が等モル  
以上 $\alpha$ 結合している $\alpha$ -グリコシル ヘスベリ  
ジンを有効成分として含有せしめた抗感受性疾  
患剤。(6) ヘスベリジンにD-グルコース残基が等モル  
以上 $\alpha$ 結合している $\alpha$ -グリコシル ヘスベリ  
ジンを有効成分として含有せしめた化粧品。

## 3. 発明の詳細な説明

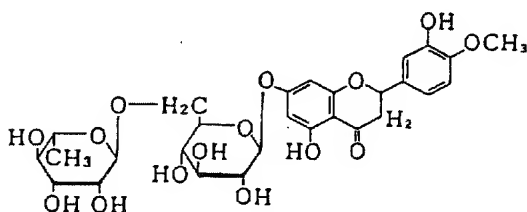
[産業上の利用分野]

本発明は、新規 $\alpha$ -グリコシル ヘスベリジン  
とその製造方法並びに用途に関し、更に詳細には、  
ヘスベリジンにD-グルコース残基が等モル以上  
 $\alpha$ 結合している $\alpha$ -グリコシル ヘスベリジン、  
および、ヘスベリジンと $\alpha$ -グルコシル糖化合物  
とを含有する溶液に糖転移酵素を作用させて新規  
 $\alpha$ -グリコシル ヘスベリジンを生成せしめ、こ  
れを採取することを特徴とする $\alpha$ -グリコシル

ヘスベリジンの製造方法、並びに、この方法で得られる $\alpha$ -グリコシル ヘスベリジンを含むことを特徴とする飲料、加工食品などの飲食物、感受性疾患の予防剤、治療剤すなわち抗感受性疾患剤、美肌剤、色白剤などの化粧品などに關する。

〔従来の技術〕

ヘスベリジンは、次に示す化学構造を有し、毛細血管の強化、出血予防、血圧調整などの生理作用を持つビタミンPとして、また、黄色色素として古くから知られ、食品、医薬品、化粧品などに利用されている。



ヘスベリジンの化学構造

しかしながら、ヘスベリジンは水に難溶で、室温では50Lの水にわずか1g程度（約0.002V/V%）しか溶けず、使用上困難を極めている。

これを改善する方法としては、ヘスベリジンにジメチル硫酸を作用させ、ヘスベリジンのメチル誘導体にして水溶性を増大する方法が知られている。

しかしながら、この方法は、有機化学的手法により行われ、反応に有毒なジメチル硫酸が使用され、得られる誘導体の精製に相当の困難が伴うことにより、その無毒性、安全性の確保、経済性などの点で満足すべきものではない。また、得られるメチル誘導体が苦味を有している欠点もある。

〔発明が解決しようとする課題〕

従来のヘスベリジンまたはその誘導体の欠点を解消し、水溶性に優れ、実質的に無味無臭で、毒性の懸念もなく、加えて、生体内で生理活性を充分発揮しうるヘスベリジン誘導体の実現が強く望まれている。

ビタミンPは、生体内で、ビタミンCの生理活性、例えば、生体結合組織の主成分であるコラーゲンの合成に必要なプロリンやリジンのヒドロキシル化反応に關与し、また、例えば、チトクロームCの $Fe^{++}$ を還元して $Fe^{+}$ にするなどの酸化還元反応に關与し、更には、白血球増加による免疫増強作用に關与するなどを増強することが知られており、生体の健康維持、増進に重要な役割をなしている。

ヘスベリジンの用途は、単に栄養素としてのビタミンP強化剤にとどまらず、その化学構造、生理作用から、単独でまたは他のビタミンなどと併用して、例えば、黄色着色剤、酸化防止剤、安定剤、品質改良剤、紫外線吸収剤などとして、飲食物などに、また、ウィルス性疾患、細菌性疾患、循環器疾患、悪性腫瘍など感受性疾患の予防剤、治療剤すなわち抗感受性疾患剤に、更には、黄色着色剤、安定剤、酸化防止剤、紫外線吸収剤、メラニン生成抑制剤などの美肌剤、色白剤などとして化粧品にまで及び、その範囲は極めて広い。

〔課題を解決するための手段〕

本発明は、上記欠点を解消するためになされたものであって、とりわけ、生化学的手法を利用して、新規ヘスベリジン誘導体を目指して鋭意研究した。

その結果、ヘスベリジンと $\alpha$ -グリコシル糖化合物とを含む溶液に糖転移酵素を作用させることにより、水溶性に優れ、実質的に無味無臭で、毒性の懸念もなく、生体内で容易に加水分解され、ヘスベリジン本来の生理活性を発揮しうる新規 $\alpha$ -グリコシル ヘスベリジンの生成しうることを見出し、その製造方法並びに飲食物、感受性疾患の予防剤、治療剤、化粧品などへの用途を確立して本発明を完成した。

また、この糖転移反応により生成した $\alpha$ -グリコシル ヘスベリジンを精製するに際しては、その反応溶液と多孔性合成吸着剤とを接触させ、その吸着性の違いを利用することにより、容易に精製できることも見出し本発明を完成した。

従って、本発明の $\alpha$ -グリコシル ヘスベリジ

ンの製造方法は、従来技術の欠点を一挙に解消し、その工業化の實現を極めて容易にするものである。

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明に用いるヘスベリジンは、高度に精製されたヘスベリジンに限る必要はなく、ヘスベリジンと、例えば、シトロニン、ナリンジン、ルチンなどのフラボノイド配糖体との混合物、更には、ヘスベリジンを含有している各種植物由来の抽出物、またはその部分精製物などが適宜使用できる。

植物組織としては、例えば、柑橘類の果実、果皮、未熟果などが有利に利用できる。

本発明に用いる $\alpha$ -グルコシル糖化合物は、同時に用いる糖転移酵素によってヘスベリジンから $\alpha$ -グリコシルヘスベリジンを生成することのできるものであればよく、例えば、アミロース、デキストリン、シクロデキストリン、マルトオリゴ糖などの澱粉部分加水分解物、更には、液化澱粉、糊化澱粉などが適宜選ばれる。

従って、 $\alpha$ -グリコシルヘスベリジンの生成を容易にするためには、糖転移酵素に好適な $\alpha$ -

グルコシル糖化合物が選ばれる。

例えば、糖転移酵素として、 $\alpha$ -グルコシダーゼ(EC 3.2.1.20)を用いる際には、マルトース、マルトトリオース、マルトテトラオースなどのマルトオリゴ糖、またはDE約10乃至70の澱粉部分加水分解物などが好適であり、シクロマルトデキストリン グルカノトランスフェラーゼ(EC 2.4.1.19)を用いる際には、シクロデキストリンまたはDE1以下の澱粉糊化物からDE約60の澱粉部分加水分解物などが好適であり、 $\alpha$ -アミラーゼ(EC 3.2.1.1)を用いる際には、DE1以下の澱粉糊化物からDE約30のデキストリン、澱粉部分加水分解物などが好適である。

また、反応時の $\alpha$ -グルコシル糖化合物濃度は、ヘスベリジンに対して約0.5乃至50倍の範囲が好適である。

反応時のヘスベリジン含有液は、ヘスベリジンをできるだけ高濃度に含有するものが望ましく、例えば、ヘスベリジンを、懸濁状で、または、高温で溶解させた、もしくはpH7.0を越えるアル

カリ側pHで溶解させた溶液状で高濃度に含有する溶液が適しており、その濃度は約0.005V/V%以上の高濃度、望ましくは、約0.01乃至10.0V/V%含有している溶液を意味する。

本発明に用いる糖転移酵素は、ヘスベリジンとこの酵素に好適な性質の $\alpha$ -グルコシル糖化合物とを含有する溶液に作用させる時、ヘスベリジンを分解せずに $\alpha$ -グリコシルヘスベリジンを生成するものであればよい。

例えば、 $\alpha$ -グルコシダーゼは、ブタの肝臓、ソバの種子などの動植物組織由来の酵素、または、ムコール(Mucor)属、ペニシリウム(Penicillium)属などに属するカビ、またはサッカロミセス(Saccharomyces)属などに属する酵母などの微生物を栄養培地で培養し得られる培養物由来の酵素が、シクロマルトデキストリン グルカノトランスフェラーゼは、バチルス(Bacillus)属、クレブシエラ(Klebsiella)属などに属する細菌培養物由来の酵素が、 $\alpha$ -アミラーゼは、バチルス属などに属する細菌、または、アスペルギルス

(Aspergillus)属などに属するカビ培養物由来の酵素などが適宜選択できる。

これらの糖転移酵素は、前記の条件を満足しさえすれば、必ずしも精製して使用する必要はなく、通常は、粗酵素で本発明の目的を達成することができる。

必要ならば、公知の各種方法で精製して使用してもよい。また、市販の糖転移酵素を利用することもできる。

使用酵素量と反応時間とは、密接な関係があり、通常は、経済性の点から約5乃至80時間で反応を終了するように酵素量が選ばれる。

また、固定化された糖転移酵素をバッチ式で繰り返し、または連続式で反応に利用することも適宜選択できる。

本発明の反応方法は、ヘスベリジンの仕込濃度を高めた状態で糖転移酵素を作用させるのが望ましい。

例えば、ヘスベリジンを懸濁状で反応せしめる場合には、約0.1乃至2.0V/V%の懸濁状ヘスベリ

ジンと適量の $\alpha$ -グルコシル糖化合物とを含有するヘスベリジン高含有液を、pH約4.5乃至6.5とし、糖転移酵素の作用しうるできるだけ高温、具体的には、約70乃至90℃に維持し、これに糖転移酵素を作用させると、ヘスベリジンが $\alpha$ -グリコシルヘスベリジンに変換するにつれて懸濁状ヘスベリジンが徐々に溶解し、同時に、 $\alpha$ -グリコシルヘスベリジンが容易に高濃度に生成する。

また、例えば、ヘスベリジンをpH7.0を越えるアルカリ側で反応せしめる場合には、pH約7.5乃至10.0の水に約0.2乃至5.0V/V%のヘスベリジンを加熱溶解し、これに適量の $\alpha$ -グルコシル糖化合物を溶解して得られるヘスベリジン高含有液を、糖転移酵素の作用しうるできるだけ高pH、高温、具体的には、pH約7.5乃至10.0、温度約50乃至80℃に維持し、これに糖転移酵素を作用させると $\alpha$ -グリコシルヘスベリジンが容易に高濃度に生成する。

この際、アルカリ性溶液中のヘスベリジンは、分解を起しやすいので、これを防ぐため、できる

だけ遮光、嫌気下に維持するのが望ましい。

更に、前記条件を組み合せる方法、例えば、約0.5乃至10.0V/V%のヘスベリジンと適量の $\alpha$ -グルコシル糖化合物とを含有するヘスベリジン高含有液をpH約7.5乃至10.0、温度約50乃至80℃に維持し、これに糖転移酵素を作用させると、 $\alpha$ -グリコシルヘスベリジンが容易に高濃度に生成する。

また、ヘスベリジンとして、例えば、約0.1乃至1.0規定のカセイソーダ水溶液、カセイカリ水溶液、炭酸ソーダ水溶液、水酸化カルシウム水、アンモニア水などの強アルカリ性水溶液に約0.5乃至10.0V/V%の高濃度に溶解させたものを用い、これに塩酸、硫酸などの酸性水溶液を加えて酵素の作用しうるpHに調整するとともに $\alpha$ -グルコシル糖化合物を加え、直ちに糖転移酵素を作用させることは、 $\alpha$ -グリコシルヘスベリジンを容易に高濃度に生成させることとなるので極めて好都合である。

この際、せっかく高濃度に溶解させたヘスベリ

ジン溶液も、酸性水溶液でpH調整することによりヘスベリジンが析出を起し易いので、そのpH調整前に、 $\alpha$ -グルコシル糖化合物や少量の $\alpha$ -グリコシルヘスベリジンなどを共存させてヘスベリジンの析出を抑制しつつ糖転移反応を開始することも有利に実施できる。

また、更に必要ならば、反応前のヘスベリジンの溶解度を高め、ヘスベリジンへの糖転移反応を容易にするために、ヘスベリジン高含有液に水と互いに溶解しうる有機溶媒、例えば、メタノール、エタノール、n-プロパノール、i s o-プロパノール、n-ブタノール、アセトール、アセトンなどの低級アルコール、低級ケトンなどを共存させることも適宜選択できる。

このようにして $\alpha$ -グリコシルヘスベリジンを生成せしめた反応溶液は、そのまま $\alpha$ -グリコシルヘスベリジン製品にすることもできる。通常は、反応溶液を濾過、濃縮してシラップ状の、更には、乾燥、粉末化して粉末状の $\alpha$ -グリコシルヘスベリジン製品にする。

本製品は、ビタミンP強化剤としてばかりでなく、安全性の高い天然型の黄色着色剤、酸化防止剤、安定剤、品質改良剤、予防剤、治療剤、紫外線吸収剤などとして、飲食物、嗜好物、飼料、餌料、抗感受性疾患剤、化粧品、プラスチック製品などの用途に有利に利用できる。

更に、精製された $\alpha$ -グリコシルヘスベリジン製品を製造する場合には、多孔性合成吸着剤による吸着性の差を利用して $\alpha$ -グリコシルヘスベリジンと $\alpha$ -グルコシル糖化合物などの夾雑物とを分離して精製すればよい。

本発明でいう多孔性合成樹脂とは、多孔性で広い吸着表面積を有し、かつ非イオン性のスチレン-ジビニルベンゼン重合体、フェノール-ホルマリン樹脂、アクリレート樹脂、メタアクリレート樹脂などの合成樹脂であり、例えば、市販されているR o h m & H a a s社製造の商品名アンバーライトX A D-1、アンバーライトX A D-2、アンバーライトX A D-4、アンバーライトX A D-7、アンバーライトX A D-8、アンバーライトX

A D-11、アンバーライトX A D-12、三菱化成工業株式会社製造の商品名ダイヤイオンH P-10、ダイヤイオンH P-20、ダイヤイオンH P-30、ダイヤイオンH P-40、ダイヤイオンH P-50、I M A C T I社製造の商品名イマクティSyn-42、イマクティSyn-44、イマクティSyn-48などがある。

本発明の $\alpha$ -グリコシルヘスベリジンを生成せしめた反応液の精製方法は、反応液を、例えば、多孔性合成吸着剤を充填したカラムに通液すると、 $\alpha$ -グリコシルヘスベリジンおよび比較的少量の未反応ヘスベリジンが多孔性合成吸着剤に吸着するのに対し、多量に共存する $\alpha$ -グルコシル糖化合物、水溶性糖類は吸着されることなくそのまま流出する。

必要ならば、糖転移酵素反応終了後、多孔性合成吸着剤に接触させるまでの間に、例えば、反応液を加熱して生じる不溶物を濾過して除去したり、ケイ酸アルミン酸マグネシウム、アルミン酸マグネシウムなどで処理して反応液中の蛋白性物質な

どを吸着除去したり、強酸性イオン交換樹脂(H型)、中塩基性または弱塩基性イオン交換樹脂(OH型)などで処理して脱塩するなどの精製方法を組み合わせて利用することも随意である。

前述のようにして、多孔性合成吸着剤カラムに選択的に吸着した $\alpha$ -グリコシルヘスベリジンと比較的少量の未反応ヘスベリジンとは、希アルカリ、水などで洗浄した後、比較的少量の有機溶媒または有機溶媒と水との混合液、例えば、メタノール水、エタノール水などを通液すれば、まず、 $\alpha$ -グリコシルヘスベリジンが溶出し、通液量を増すか有機溶媒濃度を高めるかすれば未反応ヘスベリジンが溶出してくる。

この $\alpha$ -グリコシルヘスベリジン高含有溶出液を蒸留処理して、まず有機溶媒を溜去した後、適当な濃度にまで濃縮すれば $\alpha$ -グリコシルヘスベリジンを主成分とするシラップ状製品が得られる。更に、これを乾燥し粉末化することによって、 $\alpha$ -グリコシルヘスベリジンを主成分とする粉末状製品が得られる。

この有機溶媒による $\alpha$ -グリコシルヘスベリジンおよび未反応ヘスベリジンの溶出操作は、同時に、多孔性合成吸着剤の再生操作にもなるので、この多孔性合成吸着剤の繰り返し使用を可能にする。

また、本発明の多孔性合成吸着剤による精製は、 $\alpha$ -グルコシル糖化合物、水溶性糖類だけでなく、水溶性の塩類などの夾雑物も同時に除去できる特長を有している。このようにして得られる $\alpha$ -グリコシルヘスベリジンは、次の特長を有している。

- (1) ヘスベリジンと比較して $\alpha$ -グリコシルヘスベリジンは、水溶性が極めて大きい。
- (2) ヘスベリジンと比較して $\alpha$ -グリコシルヘスベリジンは、耐光性、安定性が大きい。
- (3)  $\alpha$ -グリコシルヘスベリジンは、体内の酵素によりヘスベリジンとグルコースとに加水分解され、ヘスベリジン本来の生理活性(ビタミンP)を示す。また、ビタミンCとの併用により、それらの持つ生理活性を増強

させることができる。

- (4)  $\alpha$ -グルコシル糖化合物を含有する製品の場合には、 $\alpha$ -グリコシルヘスベリジンの効果を発揮するのみならず、 $\alpha$ -グルコシル糖化合物が賦形、増量効果や、甘味効果を発揮することができ、また、 $\alpha$ -グルコシル糖化合物を除去した精製製品の場合には、ほとんど賦形、増量することなく $\alpha$ -グリコシルヘスベリジンの効果を発揮することができ、また、実質的に無味、無臭なので自由に調味、調香することができる。

これらの特長から、 $\alpha$ -グリコシルヘスベリジンは安全性の高い天然型のビタミンP強化剤としてばかりでなく、黄色着色剤、酸化防止剤、安定剤、品質改良剤、ウィルス性疾患、細菌性疾患、循環器疾患、悪性腫瘍など感受性疾患の予防剤、治療剤、紫外線吸収剤などとして、飲食物、嗜好物、飼料、顔料、抗感受性疾患剤、美肌剤、色白剤など化粧品、更には、プラスチック製品などに有利に利用することができる。

また $\alpha$ -グリコシル ヘスベリジンは、酸味、塩から味、渋味、旨味、苦味などの呈味を有する各種物質ともよく調和し、耐酸性、耐熱性も大きいので、普通一般の飲食物、嗜好物、例えば、調味料、和菓子、洋菓子、氷菓、飲料、スプレッド、ペースト、漬物、ビン詰詰、畜肉加工品、魚肉・水産加工品、乳・卵加工品、野菜加工品、果実加工品、穀類加工品、など広範に利用することができる。また、家畜、家禽、蜜蜂、蚕、魚などの飼育動物のための飼料、餌料などにビタミンP強化剤、嗜好性向上などの目的で配合して利用することも好都合である。

その他、タバコ、トローチ、肝油ドロップ、複合ビタミン剤、口中清涼剤、口中香錠、うがい薬、経管栄養剤、内服薬、注射剤、練歯みがき、口紅、リップクリーム、日焼け止めなど各種固状、ペースト状、液状の嗜好物、感受性疾患の予防剤、治療剤、すなわち、抗感受性疾患剤、美肌剤、色白剤などの化粧品などに配合して利用することも有利に実施でき、更には、紫外線吸収剤、劣化防

止剤などとしてプラスチック製品などに配合して利用することも有利に実施できる。

また、本発明でいう感受性疾患とは、 $\alpha$ -グリコシル ヘスベリジンによって予防され若しくは治療される疾患であり、それが、例えば、ウィルス性疾患、細菌性疾患、外傷性疾患、免疫疾患、リウマチ、糖尿病、循環器疾患、悪性腫瘍などであってもよい。 $\alpha$ -グリコシル ヘスベリジンの感受性疾患予防剤、治療剤は、その目的に応じてその形状を自由に選択できる。例えば、噴霧剤、点眼剤、点鼻剤、うがい剤、注射剤などの液剤、軟膏、はっみ剤、クリームのようなペースト剤、粉剤、顆粒、カプセル剤、錠剤などの固剤などである。製剤に当たっては、必要に応じて、他の成分、例えば、治療剤、生理活性物質、抗生物質、補助剤、増量剤、安定剤、着色剤、着香剤などの1種また2種以上と併用することも随意である。

投与量は、含量、投与経路、投与頻度などによって適宜調節することができる。通常、 $\alpha$ -グリコシル ヘスベリジンとして、成人1日当り、約0.0

01乃至10.0グラムの範囲が好適である。

また、化粧品の場合も、大体、前述の予防剤、治療剤に準じて利用することができる。

$\alpha$ -グリコシル ヘスベリジンを利用する方法としては、それらの製品が完成するまでの工程で、例えば、混和、混捏、溶解、浸漬、浸透、散布、塗布、噴霧、注入など公知の方法が適宜選ばれる。

以下、本発明の $\alpha$ -グリコシル ヘスベリジンの一例を実験で説明する。

#### 実験 1 $\alpha$ -グリコシル ヘスベリジンの調製

##### (1) 糖転移反応

ヘスベリジン1重量部およびデキストリン(D E 20) 6重量部に水5,000重量部を加えて加熱、溶解し、これにバチルス・ステアロサーモフィルス(*Bacillus stearothermophilus*)由来のシクロマルトデキストリン グルカノトランスフェラーゼ(株式会社林原生物化学研究所販売)をデキストリン1グラム当り20単位加え、pH 6.0、70℃に維持して18時間反応させ、その後、加熱失活させ、 $\alpha$ -グリコシル ヘスベリジン

含有液を得た。

##### (2) 精製

(1)の方法で得た反応液を濾過し、濾液を多孔性合成吸着剤、商品名ダイヤイオンHP-10(三菱化成工業株式会社販売)を充填したカラムにSV2で通液した。このカラムを水で洗浄後、50V/V%エタノールを通液し、この溶出液を濃縮して溶媒を溜去し、粉末化して淡黄色の $\alpha$ -グリコシル ヘスベリジン標品[I]を原料のヘスベリジン重量に対して約130%の収率で得た。

##### (3) アミラーゼによる加水分解

(2)の方法で得た $\alpha$ -グリコシル ヘスベリジン標品[I]を水に1V/V%に溶解し、これにグルコアミラーゼ(EC 3.2.1.3、生化学工業株式会社販売)を該標品1グラム当り100単位加え、pH 5.0、55℃に維持して5時間反応させた。反応液を加熱して酵素を失活させ、濾過し、濾液を多孔性合成吸着剤、商品名ダイヤイオンHP-10(三菱化成工業株式会社販売)のカラムにSV2で通液した。その結果、溶液中の $\alpha$ -グリ

コシル ヘスベリジンと未反応ヘスベリジンとが多孔性合成吸着剤に吸着し、グルコース、塩類などは吸着することなく流出した。決いで、カラムを水で過液、洗浄した後、エタノール水溶液濃度を段階的に高めながら過液し、 $\alpha$ -グリコシル ヘスベリジン画分を採取し、減圧濃縮し、粉末化して、淡黄色の $\alpha$ -グリコシルヘスベリジン標品[II]を固形物当り原料のヘスベリジン重量に対して約70%の収率で得た。

また、グルコアミラーゼに代えて、 $\beta$ -アミラーゼ(EC 3.2.1.2)、(生化学工業株式会社販売)を用いて、前述の方法に準じて、 $\alpha$ -グリコシルヘスベリジン標品[I]を加水分解し、精製、濃縮、粉末化して、淡黄色の $\alpha$ -グリコシルヘスベリジン標品[III]を原料のヘスベリジン重量に対して約70%の収率で得た。

## 実験 2 $\alpha$ -グリコシルヘスベリジンの理化学的性質

### (1) 水溶性の向上

実験1(1)の方法で糖転移反応し調製した $\alpha$ -

グリコシルヘスベリジン含有液と、この方法で用いる酵素を予め加熱失活させて実験1(1)の方法に準じて処理した対照液とを、4℃の冷室に2日間放置したところ、対照液では、ヘスベリジンが析出して白濁したのに対し、 $\alpha$ -グリコシルヘスベリジン含有液は透明のままであった。

従って、糖転移反応により生成した $\alpha$ -グリコシルヘスベリジンは、水溶性が著しく向上している。

### (2) 溶剤に対する溶解性

$\alpha$ -グリコシルヘスベリジン標品は、水、0.1規定カセイソーダ、0.1規定塩酸に易溶、メタノール、エタノール微溶、エーテル、ベンゼン、クロロホルムに不溶。

### (3) 紫外線吸収スペクトル

$\alpha$ -グリコシルヘスベリジン標品を0.1規定カセイソーダ溶液に溶解して、紫外線吸収スペクトルを調べたところ、標品[I]、標品[II]および標品[III]のいずれも、ヘスベリジンの場

合と同じ286nm付近に吸収極大を有していた。

### (4) 赤外線吸収スペクトル

KBr錠剤法によって、 $\alpha$ -グリコシルヘスベリジン標品の赤外線吸収スペクトルを調べた。 $\alpha$ -グリコシルヘスベリジン標品[I]の結果を第1図に、標品[II]の結果を第2図に示す。

### (5) 加水分解に対する安定性

(a)  $\alpha$ -グリコシルヘスベリジン標品は、ブタの肝臓由来の $\alpha$ -グルコシダーゼ(EC 3.2.1.20)により加水分解され、ヘスベリジンとD-グルコースとを生成する。

(b)  $\beta$ -グルコシダーゼによっては加水分解されない。

### (6) 薄層クロマトグラフィー

#### (a) 分析方法

プレート：メルク社製、

商品名キーゼルゲル80F<sub>254</sub>

展開溶媒：n-ブタノール：酢酸：水=4:2:1

発色剤：1V/V%硫酸第二セリウム10V/V%

#### 硫酸水溶液

#### (b) 分析結果

$\alpha$ -グリコシルヘスベリジン標品を分析したところ、標品[I]の場合には、Rf0.69のヘスベリジンのスポット以外に、新たに、Rf0.48、0.34、0.22、0.16、0.10、0.04および原点にスポットが認められ、標品[II]の場合には、Rf0.48のスポットが認められ、標品[III]の場合には、Rf0.48、0.34のスポットが認められた。

以上の理化学的性質から、標品[I]、標品[II]および標品[III]に含まれるRf0.48を示す物質は、ヘスベリジン1モルにD-グルコース残基が1モル $\alpha$ 結合した $\alpha$ -グルコシルヘスベリジンと判断され、標品[I]および標品[III]に含まれるRf0.34を示す物質は、ヘスベリジン1モルにD-グルコースが2モル $\alpha$ 結合した $\alpha$ -ジグルコシルヘスベリジンと判断され、同様に、標品[I]に含まれるRf0.22以下の複数のスポットを示す物質は、ヘスベ



リジン1モルにD-グルコース残基が3モル以上 $\alpha$ 結合した $\alpha$ -オリゴグルコシルヘスペリジンであると判断される。

このように、本願発明の $\alpha$ -グルコシルヘスベリジンはヘスベリジンにD-グルコース残基が等モル以上 $\alpha$ 結合した水溶性良好な新規ヘスベリジン糖誘導体であって、生体内に摂取されると、 $\alpha$ -グルコシダーゼによって容易に加水分解され、ヘスベリジン本来の生理活性を発揮する。

### 実験 3 急性毒性

7周令のdd系マウスを使用して、実験1(2)の方法で調製した $\alpha$ -グリコシルヘスペリジン標品[I]を経口投与して急性毒性テストをしたところ、5gまで死亡例は見られず、これ以上の投与は困難であった。

従って、本物質の毒性は極めて低い。なお、実験1(3)の方法で調製した $\alpha$ -グリコシルヘスベリジン標品[II]を用いて本テストを行ったところ、同様の結果を得、毒性の極めて低いこ

ペリジンなどの $\alpha$ -グリコシル ヘスペリジンに転換していた。反応液を加熱して酵素を失活させ、濾過し、濾液を、常法に従って、イオン交換樹脂(H型およびOH型)で脱塩精製し、濃縮してシラップ状の $\alpha$ -グルコシル糖化合物を含有する $\alpha$ -グリコシル ヘスペリジン製品を、固形物当り原料重量に対して約90%の収率で得た。

本品は、ビタミンP強化剤としてばかりでなく、安全性の高い天然型の黄色着色剤、酸化防止剤、安定剤、品質改良剤、予防剤、治療剤、紫外線吸収剤などとして、飲食物、嗜好物、飼料、餌料、抗感受性疾患剤、化粧品、プラスチック製品などの用途に有利に利用できる。

実施例 A-2  $\alpha$ -グルコシル ヘスペリジン

実施例 A-1 の方法に準じて調製したシラップ状の  $\alpha$ -グルコシル糖化合物を含有する  $\alpha$ -グリコシルヘスペリジン製品 1 重量部を水 4 重量部に溶解し、これにグルコアミラーゼ (EC 3.2.1.3、生化学工業株式会社販売) を  $\alpha$ -グ

とが判明した。

以下、本発明の実施例として、 $\alpha$ -グリコシルヘスペリジンの製造例を実施例Aで、 $\alpha$ -グリコシルヘスペリジンの用途例を実施例Bで述べる。

実施例 A-1  $\alpha$ -グリコシル ヘスペリジン

ヘスペリジン1重量部を1規定カセイソーダ溶液4重量部で溶解し、これに0.01規定塩酸溶液を加えて中和するとともにデキストリン（DE10）4重量部を加え、直ちにパチルス・ステアロサーモフィルス由来のシクロマルトデキストリン グルカノトランスフェラーゼ（株式会社林原生物化学研究所販売）をデキストリングラム当たり20単位加え、pH8.0、75℃に維持し攪拌しつつ24時間反応させた。反応液を薄層クロマトグラフィーで分析したところ、ヘスペリジンの約70%が、 $\alpha$ -グルコシル ヘスペリジン、 $\alpha$ -ジグルコシル ヘスペリジン、 $\alpha$ -トリグルコシル ヘスペリジン、 $\alpha$ -テトラグルコシル ヘスペリジン、 $\alpha$ -ペンタグルコシル ヘス

リコシル ヘスベリジン 製品固形物グラム当り  
 100単位加え、50℃、5時間 反応させた。反応液  
 を 薄層クロマトグラフィーで分析したところ、  
 α-グリコシル ヘスベリジンは、α-グルコ  
 シル ヘスベリジンに 転換していた。

反応液を加熱して酵素を失活させ、濾過し、濾液を多孔性合成吸着剤、商品名ダイヤイオン H P - 10（三菱化成工業株式会社販売）のカラムに S V 2 で通液した。その結果、溶液中の  $\alpha$ -グルコシル ヘスペリジンと未反応ヘスペリジンとが多孔性合成吸着剤に吸着し、グルコース、塩類などは吸着することなく流出した。次いで、カラムを水で通液、洗浄した後、エタノール水溶液濃度を段階的に高めながら通液し、 $\alpha$ -グルコシル ヘスペリジン画分を採取し、減圧濃縮し、粉末化して、粉末状の  $\alpha$ -グルコシル ヘスペリジンを固形物当り原料のヘスペリジン重量に対して約 60% の収率で得た。

$\alpha$ -グルコシル ヘスベリジンを経で加水分解したところ、ヘスベリジン1モルに対し、1-

ラムノース1モル、D-グルコース2モルを生成し、また、 $\alpha$ -グリコシル ヘスペリジンに、ブタの肝臓から抽出し部分精製した $\alpha$ -グリコシダーゼを作用させると、ヘスペリジンとD-グルコースとに加水分解されることが判明した。

本 $\alpha$ -グリコシル ヘスペリジンは、高度に精製された水溶性の高いビタミンP強化剤として、また、黄色着色剤、酸化防止剤、安定剤、品質改良剤、予防剤、治療剤、紫外線吸収剤などとして、飲食物、嗜好物、抗感受性疾患剤、化粧品などに有利に利用できる。

実施例 A-3  $\alpha$ -グリコシル ヘスペリジン  
ヘスペリジン1重量部を水500重量部にpH9.5で加熱溶解し、別にデキストリン(DE8)10重量部を水10重量部に加熱溶解し、次いで、これら溶液を混合し、これにシクロマルトデキストリン グルカノトランスフェラーゼをデキストリン1グラム当り30単位加え、pH8.2、85℃に維持して攪拌しつつ40時間反応させた。

反応液を薄層クロマトグラフィーで分析した

嗜好物、飼料、顔料、抗感受性疾患剤、化粧品、プラスチック製品などの用途に有利に利用できる。

実施例 A-4  $\alpha$ -グリコシル ヘスペリジン  
(1)  $\alpha$ -グリコシダーゼ標品の調製

マルトース4W/V%、リン酸1カリウム0.1V/V%、硝酸アンモニウム0.1V/V%、硫酸マグネシウム0.05W/V%、塩化カリウム0.05W/V%、ポリペプトン0.2V/V%、炭酸カルシウム1W/V% (別に乾熱滅菌して補菌時に無菌的に添加) および水からなる液体培地500重量部にムコール・ジャパニカス(Mucor javanicus) IFO 4570を温度30℃で44時間瓊脂培養した。培養終了後、菌糸体を採取し、その湿菌糸体48重量部に対し、0.5M酢酸緩衝液(pH5.3)に溶解した4M尿素液500重量部を加え、30℃で40時間静置した後、遠心分離した。この上清を流水中で一夜透析した後、硫酸0.9飽和とし、4℃で一夜放置して生成した塩析物を濾取し、0.01M酢酸緩衝液(pH5.3)50重量部に懸濁溶解した後、遠心分

ところ、ヘスペリジンの約80%が $\alpha$ -グリコシル ヘスペリジンに転換していた。

反応液を加熱して酵素を失活させ、濾過し濾液を多孔性合成吸着剤、商品名アンバーライトXAD-7(Rohm & Haas社製造)のカラムにSV1.5で通液した。

その結果、溶液中の $\alpha$ -グリコシル ヘスペリジンと未反応ヘスペリジンとが多孔性合成吸着剤に吸着し、デキストリン、オリゴ糖、塩類などは吸着することなく流出した。

このカラムを水で通液、洗浄した後、50V/V%メタノールを過液して、 $\alpha$ -グリコシル ヘスペリジンおよびヘスペリジンを溶出し、これを濃縮し、粉末化して、粉末状 $\alpha$ -グリコシル ヘスペリジン製品を原料のヘスペリジン重量に対して約120%の収率で得た。

本品は、水溶性の高いビタミンP強化剤としてばかりでなく、安全性の高い天然型の黄色着色剤、酸化防止剤、安定剤、品質改良剤、予防剤、治療剤、紫外線吸収剤などとして、飲食物、

離して上清を採取し、 $\alpha$ -グリコシダーゼ標品とした。

## (2) $\alpha$ -グリコシル ヘスペリジンの調製

ヘスペリジン5重量部を0.5規定カセイソーダ溶液100重量部に加熱溶解し、これに0.01規定塩酸溶液を加えてpH9.5にするとともにデキストリン(DE30)20重量部を加え、直ちに(1)の方法で調製した $\alpha$ -グリコシダーゼ標品10重量部を加え、pH8.5に維持して攪拌しつつ55℃で40時間反応させた。

反応液を薄層ペーパークロマトグラフィーで分析したところ、ヘスペリジンの約60%が $\alpha$ -グリコシル ヘスペリジンに転換していた。

反応液を実施例A-3と同様に精製し、濃縮、粉末化して粉末状 $\alpha$ -グリコシル ヘスペリジン製品を原料のヘスペリジン重量に対して約110%の収率で得た。

本品は、実施例A-3の場合と同様に、水溶性の高いビタミンP強化剤としてばかりでなく、安全性の高い天然型の黄色着色剤、酸化防止剤、

安定剤、品質改良剤、予防剤、治療剤、紫外線吸収剤などとして、各種用途に利用できる。

#### 実施例 B-1 ハードキャンディー

還元麦芽糖水飴（林原商事株式会社販売、登録商標マビット）1,500重量部を加熱し、減圧下で水分約2%以下になるまで濃縮し、これにクエン酸15重量部および実施例A-3の方法で得た粉末状α-グリコシル ヘスペリジン1重量部および少量のレモン香料を混和し、次いで常法に従って、成形、包装してハードキャンディーを得た。

本品は、ビタミンPを強化した黄色のレモンキャンディーであって、低う蝕性、低カロリーである。

#### 実施例 B-2 フキの水煮

フキを皮むきし、適当な長さに切断して、薄い食塩水に数時間浸し、これを実施例A-1の方法で得たシラップ状α-グリコシル ヘスペリジンと青色1号とを配合して調製した緑色着色料を含有する液で煮込んで、緑色の鮮かなフ

キの水煮を得た。

本品は、各種和風料理の材料として色どりを添えとともに、食物繊維としての生理効果をも発揮する。

#### 実施例 B-3 求肥

モチ種澱粉1重量部に水1.2重量部を混合し、加熱糊化しつつ、これに砂糖1.5重量部、結晶性β-マルトース（林原株式会社製造、登録商標サンマルト）0.7重量部、水飴0.3重量部および実施例A-1の方法で得たシラップ状α-グリコシル ヘスペリジン0.2重量部を混和し、以後、常法に従って、成形、包装して求肥を製造した。

本品は、風味、口当たりとも良好な求肥で、きびだんご風の和菓子である。

#### 実施例 B-4 混合甘味料

はちみつ100重量部、異性化糖50重量部、黒砂糖2重量部および実施例A-4の方法で得た粉末状α-グリコシル ヘスペリジン1重量部を混合して混合甘味料を得た。

本品はビタミンPを強化した甘味料で健康食品として好適である。

#### 実施例 B-5 サンドクリーム

結晶性α-マルトース（林原株式会社製造、登録商標ファイントース）1,200重量部、ショートニング1,000重量部、実施例A-3の方法で得た粉末状α-グリコシル ヘスペリジン10重量部、レシチン1重量部、レモンオイル1重量部、バニラオイル1重量部を常法により混和してサンドクリームを製造した。

本品は、ビタミンP強化、黄色着色したサンドクリームで、口当たり、溶け具合、風味とも良好である。

#### 実施例 B-6 錠剤

アスコルビン酸20重量部に結晶性β-マルトース13重量部、コーンスターチ4重量部および実施例A-2の方法で得た粉末状α-グルコシルヘスペリジン3重量部を均一に混合した後、直径12mm、20R杵を用いて、打錠し錠剤を得た。

本品は、アスコルビン酸とα-グルコシル

ヘスペリジンとの複合ビタミン剤で、アスコルビン酸の安定性もよく、飲み易い錠剤である。

#### 実施例 B-7 カプセル剤

酢酸カルシウム・三水塩10重量部、L-乳酸マグネシウム・三水塩50重量部、マルトース57重量部、実施例A-2の方法で得たα-グルコシルヘスペリジン20重量部及びエイコサペンタエン酸20%含有γ-シクロデキストリン包接化合物12重量部を均一に混合し、顆粒成形機にかけて顆粒とした後、常法に従って、ゼラチンカプセルに封入して、一カプセル150mg入のカプセル剤を製造した。

本品は、血中コレステロール低下剤、免疫賦活剤、美肌剤などとして、感受性疾患の予防剤、治療剤、健康増進用食品などとして有利に利用できる。

#### 実施例 B-8 軟膏

酢酸ナトリウム・三水塩1重量部、DL-乳酸カルシウム4重量部をグリセリン10重量部と均一に混合し、この混合物を、ワセリン50重量部、

木ロウ10重量部、ラノリン10重量部、ゴマ油14.5重量部、実施例A-4の方法で得た $\alpha$ -グリコシルヘスベリジン1重量部及びハッカ油0.5重量部の混合物に加えて、更に均一に混和して軟膏を製造した。

本品は、日焼け止め、美肌剤、色白剤などとして、更には外傷、火傷の治療促進剤などとして有利に利用できる。

#### 実施例 B-9 注射剤

実施例A-2の方法で得た $\alpha$ -グリコシルヘスベリジンを水に溶解し、常法に従って、精製濾過してバイロゲンフリーとし、この溶液を20mL容アンプルに $\alpha$ -グリコシルヘスベリジン50mgになるように分注し、これを減圧乾燥し、封入して注射剤を製造した。

本注射剤は、単体で、または、他のビタミン、ミネラルなどと混合して筋肉内又は静脈内に投与できる。また、本品は、低温貯蔵の必要もなく、使用に際しての生理食塩水などへの溶解性は極めて良好である。

ビリボフラビン0.01重量部からなる配合物を調製する。この配合物24gずつをラミネートアルミ製小袋に充填し、ヒートシールして経管栄養剤を調製した。

本経管栄養剤は、一袋を約300乃至500mLの水に溶解し、経管方法により鼻腔、胃、腸などへの経口的又は非経口的栄養補給液としても有利に利用できる。

#### 実施例 B-12 浴用剤

DL-乳酸ナトリウム21重量部、ビルビン酸ナトリウム8重量部、実施例A-1の方法で得た $\alpha$ -グリコシルヘスベリジン5重量部及びエタノール40重量部を、精製水28重量部及び着色料、香料の適量と混合し、浴用剤を製造した。

本品は、美肌剤、色白剤として好適であり、入浴用の湯に100乃至10,000倍に希釈して利用すればよい。本品は、入浴用の湯の場合と同様に、洗顔用水、化粧水などに希釈して利用することも有利に実施できる。

#### 実施例 B-13 乳 液

#### 実施例 B-10 注 射 剤

塩化ナトリウム6重量部、塩化カリウム0.3重量部、塩化カルシウム0.2重量部、乳酸ナトリウム3.1重量部、マルトース45重量部及び実施例A-2の方法で得た $\alpha$ -グリコシルヘスベリジン1重量部を水1,000重量部に溶解し、常法に従って、精製濾過してバイロゲンフリーとし、この溶液を滅菌したプラスチック容器に250mLずつ充填して注射剤を製造した。

本品は、ビタミンP補給としてだけでなく、カロリー補給、ミネラル補給のための注射剤で、病中、病後の治療促進、回復促進などに有利に利用できる。

#### 実施例 B-11 経管栄養剤

結晶性 $\alpha$ -マルトース20重量部、グリシン1.1重量部、グルタミン酸ナトリウム0.18重量部、食塩1.2重量部、クエン酸1重量部、乳酸カルシウム0.4重量部、炭酸マグネシウム0.1重量部、実施例A-3の方法で得た $\alpha$ -グリコシルヘスベリジン0.1重量部、チアミン0.01重量部及

ポリオキシエチレンベヘニルエーテル0.5重量部、テトラオレイン酸ポリオキシエチレンソルビトール1重量部、親油型モノステアリン酸グリセリン1重量部、ビルビン酸0.5重量部、ベヘニルアルコール0.5重量部、アボガド油1重量部、実施例A-3の方法で得た $\alpha$ -グリコシルヘスベリジン1重量部、ビタミンE及び防腐剤の適量を、常法に従って加熱溶解し、これにL-乳酸ナトリウム1重量部、1,3-ブチレングリコール5重量部、カルボキシビニルポリマー0.1重量部及び精製水85.3重量部を加え、ホモゲナイザーにかけ乳化し、更に香料の適量を加えて攪拌混合し乳液を製造した。

本品は、日焼け止め、美肌剤、色白剤などとして有利に利用できる。

#### 実施例 B-14 クリーム

モノステアリン酸ポリオキシエチレングリコール2重量部、自己乳化型モノステアリン酸グリセリン5重量部、実施例A-2の方法で得た $\alpha$ -グリコシルヘスベリジン2重量部、流動パラ

フィン1重量部、トリオクタン酸グリセリル10重量部及び防腐剤の適量を、常法に従って加熱溶解し、これにL-乳酸2重量部、1,3-ブチレングリコール5重量部及び精製水66重量部を加え、ホモゲナイザーにかけ乳化し、更に香料の適量を加えて攪拌混合しクリームを製造した。

本品は、日焼け止め、美肌剤、色白剤などとして有利に利用できる。

#### 〔発明の効果〕

本文で述べたごとく、本発明の新規物質であるヘスベリジンにD-グルコース残基が等モル以上 $\alpha$ 結合している $\alpha$ -グリコシルヘスベリジンは、水溶性に優れ、実質的に無味無臭で、毒性の懸念もなく、生体内で容易にヘスベリジンとD-グルコースとに加水分解され、ヘスベリジン本来の生理活性を発揮する。

また、この $\alpha$ -グリコシルヘスベリジンが、ヘスベリジンと $\alpha$ -グルコシル糖化合物とを含有する溶液に、糖転移酵素を作用させる生化学的手法により容易に生成できることより、経済性に優

れ、その工業実施も容易である。

更に、ヘスベリジンの仕込濃度を高めて反応させることができ、 $\alpha$ -グリコシルヘスベリジンを容易に高濃度に生成しうることを見出し、併せて、この反応液の精製に際して、反応液を多孔性合成吸着剤と接触させて $\alpha$ -グリコシルヘスベリジンを精製できることも見出したことにより、 $\alpha$ -グリコシルヘスベリジンの大量製造を極めて容易にするものである。

また、このようにして得られる $\alpha$ -グリコシル

ヘスベリジンは、水溶性良好、耐光性・安定性良好、充分な生理活性を発揮するなどの特徴を有しており、安全性の高い天然型のビタミンP強化剤としてばかりでなく、黄色着色剤、酸化防止剤、安定剤、品質改良剤、予防剤、治療剤、紫外線吸収剤、劣化防止剤などとして、飲食物、嗜好物、飼料、餌料、抗感受性疾患剤、美肌剤、色白剤など化粧品、更には、プラスチック製品などに有利に利用される。

従って、本発明による $\alpha$ -グリコシルヘスベ

リジンの工業的製造法とその用途の確立は、飲食品、化粧品、医薬品、プラスチック産業における工業的意義が極めて大きい。

#### 4. 図面の簡単な説明

第1図は、本発明の一例として、 $\alpha$ -グリコシルヘスベリジン標品[I]の赤外線吸収スペクトルを示す。

第2図は、本発明の一例として、 $\alpha$ -グリコシルヘスベリジン標品[II]の赤外線吸収スペクトルを示す。

特許出願人

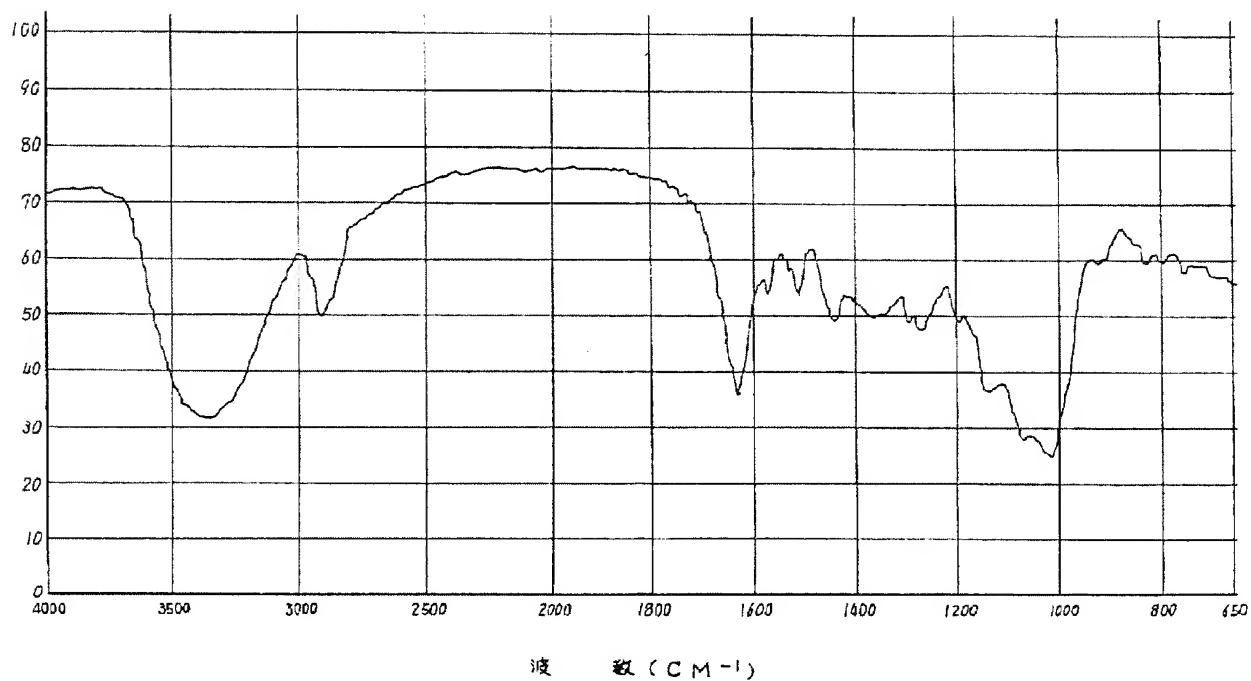
株式会社林原生物化学研究所

代表者 林 原

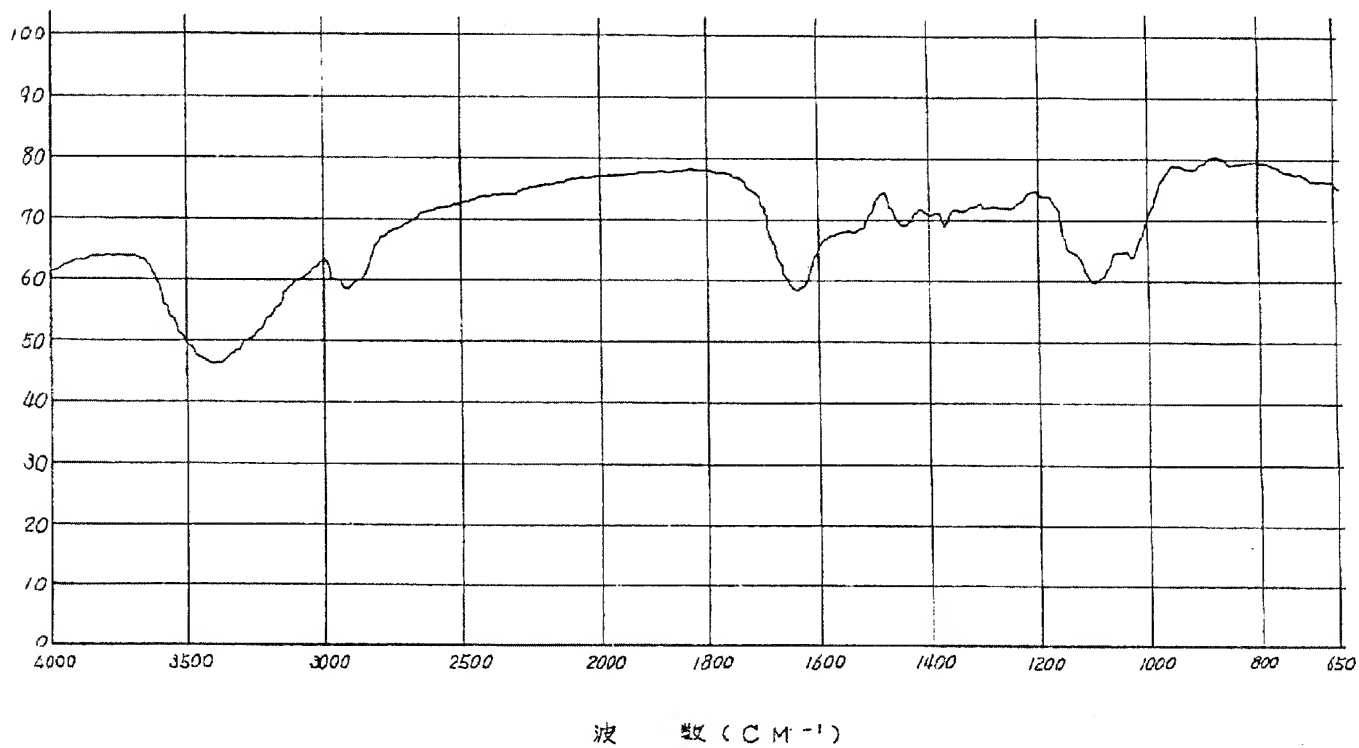


図面の浄書

才 1 図



才 2 図



手 続 補 正 書 (方式)

平成1年10月25日

特許庁長官 吉 田 文 毅 殿

1. 事件の表示

平成1年特許願第141902号

2. 発明の名称

α-グリコシルヘスペリジンとその製造方法並びに用途

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

岡山県岡山市下石井1丁目2番3号

ハヤシバロセイブツカガク

株式会社林原生物化学研究所

代表者 林 原

健



4. 補正命令の日付

平成1年9月26日(発送日)

5. 補正の対象

図面全図

6. 補正の内容

別紙のように図面を補正しま



【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】平成 9 年（1997）3 月 31 日

【公開番号】特開平 3—7593

【公開日】平成 3 年（1991）1 月 14 日

【年通号数】公開特許公報 3—76

【出願番号】特願平 1—141902

【国際特許分類第 6 版】

C12P 19/60

A23L 1/30

A61K 7/00

31/70 ABF

C07H 17/07

【F1】

C12P 19/60 7432-4B

A23L 1/30 Z 9359-4B

A61K 7/00 F 9271-4C

X 9271-4C

31/70 ABF 8314-4C

C07H 17/07 8615-4C

## 手続補正書

平成 8 年 5 月 26 日

特許庁長官 青川 祐二 殿



## 1. 事件の表示

平成 1 年特許願第 141902 号

## 2. 発明の名称

α-グリコシル ヘスペリジンとその製造方法並びに用途

## 3. 補正をする者

発明者の関係者 特許出願人

岡山県岡山市下石井 1-1-1 2 番 3 号

株式会社林源生化学研究所

代表者 林 源 生



## 4. 補正の対象

明細書全文

## 5. 補正の内容

明細書全文を、お紙のように補正します。

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

α-グリコシル ヘスペリジンとその製造方法並びに用途

## 2. 特許請求の範囲

- (1) ヘスペリジンに D-グルコース残基が等モル以上 α 結合している α-グリコシル ヘスペリジン。
- (2) α-グリコシル ヘスペリジンが、粉末剤、黄色着色剤、酸化防止剤、安定剤、紫外線吸収剤、美肌剤、または白色白剤である特許請求の範囲第 (1) 項記載の α-グリコシル ヘスペリジン。
- (3) ヘスペリジンと α-グルコシル糖化合物とを含有する溶液に、糖転移酵素を作用させて、α-グリコシル ヘスペリジンを生成せしめ、これを採取することを特徴とする α-グリコシル ヘスペリジンの製造方法。
- (4) 糖転移酵素を作用させ、次いで、アミラーゼ処理用液を、α-グルコシル ヘスペリジンおよびまたは α-マルトシル ヘスペリジンに生成せしめ、これを採取することを特徴とする α-グリコシル ヘスペリジンの製造方法。
- (5) ヘスペリジンと α-グルコシル糖化合物とを含有する溶液に、糖転移酵素を作用させて、α-グリコシル ヘスペリジンを生成せしめ、次いで、この溶液を多孔性合成吸着剤に接触させて精製し、α-グリコシル ヘスペリジンを採取することを特徴とする α-グリコシル ヘスペリジンの製造方法。
- (6) ヘスペリジンに D-グルコース残基が等モル以上 α 結合している α-グリコシル ヘスペリジンを含むせしめた組成物。
- (7) 組成物が、食品物、医薬品原料組成物、または化粧品であることを特徴とする特許請求の範囲第 (4) 項記載の組成物。
- (8) 組成物が、α-グリコシル ヘスペリジンとともに、チアミン、リボフラビン、ビタミン C およびビタミン B から選ばれるビタミンを含有することを特徴とする特許請求の範囲第 (6) 項または第 (7) 項記載の組成物。
- (9) α-グリコシル ヘスペリジンと、ヘスペリジンを含む水溶液に共存させることを特徴とするヘスペリジンの析出抑制方法。

## 3. 発明の詳細な説明

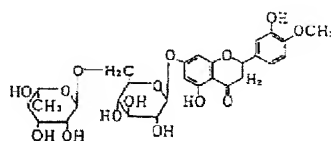


## 〔産業上の利用分野〕

本発明は、新規α-グリコシル ヘスベリジンと、その製造方法、並びに産業に關し、更に詳細には、ヘスベリジンにD-グルココース残基が糖モル以上α結合しているα-グリコシル ヘスベリジン、および、ヘスベリジンとα-グルコシル糖化合物とを含有する溶液に、酵素酵素系を作用させて、新規α-グリコシルヘスベリジンを生成せしめ、これを採取することを特徴とするα-グリコシルヘスベリジンの製造方法、並びに、この方法で得られるα-グリコシルヘスベリジンを含有せしめることを特徴とする飲料、加工食品などの飲食物、感受性疾患の予防剤、治療剤などの医薬品、化粧料、美白剤などの化粧品など、各種組成物への用途に關する。

## 〔従来の技術〕

ヘスベリジンは、次に示す化学構造を有し、褐藻多糖の誘化、出血予防、血圧降下などの生薬作用を持つビタミンDとして、また、黄色色素として古くから知られ、食品、医薬品、化粧品などに利用されている。



ヘスベリジンの化学構造

ビタミンDは、生体内で、ビタミンDの生理活性、例えば、生体結合組織の主要成分であるコラーゲンの合成に必要なプロリンやリジンなどのヒドロキシル化反応に關し、また、例えば、チトクロームCの $Fe^{+++}$ を還元して $Fe^{++}$ にするなどの酸化還元反応に關与し、更には、白血球増加による免疫増強作用に關与するなどの増

強作用が知られており、生体の個体調節、増進に重要な役割を果している。

ヘスベリジンの用途は、主に栄養素としてのビタミンD強化剤にとどまらず、その光増強、生薬作用から、甲殻、または他のビタミンDと併用して、例えば、黄色色素剤、酸化防止剤、安定剤、品質改良剤、紫外線吸収剤などとして飲食物などに、また、ウイルス性疾患、細菌性疾患、腸道感染症、腸炎、腸癌などの感受性疾患の予防剤、治療剤、すなわち感受性疾患剤に、更には、黄色色素剤、安定剤、酸化防止剤、紫外線吸収剤、メラニン生成抑制剤などとして美粧剤、化粧品などの化粧品にまで及び、その用途範囲は極めて広い。

しかしながら、ヘスベリジンは水に難溶で、室温では50%の水にわずか1g程度（約0.102%）しか溶けず、使用上困難を要している。

これを改善する方法としては、ヘスベリジンにジメチル硫酸を作用させ、ヘスベリジンジメチル硫酸体にして、水溶性を増大する方法が知られている。

しかしながら、この方法は、有機化学的方法により行われ、反応に有害なジメチル硫酸を使用することから、得られる硫酸体の構造に相当の問題が伴い、その無毒性、食安全性の確保、経口性などが満足すべきものではなかった。また、得られるジメチル硫酸体が害毒を可及的に除去できない。

〔発明が解決しようとする課題〕

従来のヘスベリジン、またはその硫酸体の欠点を解消し、水溶性に優れ、実質的に無味、無臭で、毒性の懸念もなく、加えて、生体内で生理活性を充分発揮するヘスベリジン硫酸体の実用が望まれている。

〔課題を解決するための手段〕

本発明は、上記欠点を解消するためのものであって、とりわけ、化学的手法を利用して、新規ヘスベリジン硫酸体を目指して鋭意研究した結果に基づいたものである。

その結果、ヘスベリジンとα-グルコシル糖化合物とを含有する溶液に、酵素酵素系を作用させることにより、水溶性に優れ、実質的に無味、無臭で、毒性の懸念もなく、生体内で容易に加水分解され、ヘスベリジン本来の生理活性を発揮する新規α-グリコシルヘスベリジンを生成することを見出し、その製造方法、並びに組成物、感受性疾患の予防剤、治療剤、化粧品など、各種組成物への

効果を確立して、本発明を完成した。

また、この糖転移反応により生成したα-グリコシルヘスベリジンを精製するに際しては、その反応溶液と多孔性合成樹脂類とを接触させ、その吸着性の差を利用することにより、容易に精製することも見出し、本発明を完成した。

従って、本発明のα-グリコシルヘスベリジンの製造方法は、従来の技術の欠点を一挙に解消し、その工業化の実現を極めて容易にするものである。

以下、本発明を、詳細に説明する。

本発明に用いるヘスベリジンとしては、真珠に精製されたヘスベリジンに限る必要はなく、ヘスベリジンと、例えば、シトロニン、ナリンジン、ルチンなどのフラボノイド糖糖体との混合物、更には、ヘスベリジンを含有している各種植物由来の抽出物、ジュース、またはその部分精製物などが、適宜使用できる。

植物組織としては、例えば、柑橘類の果実、皮、未熟果などが、有利に利用できる。

本発明に用いるα-グルコシル糖化合物としては、同時に用いる糖転移酵素系によってヘスベリジンからα-グリコシルヘスベリジンを生成することであるものであればよく、例えば、アミロース、アキストリン、シクロアキストリン、マルトオリゴ糖などの糖部分加水分解物、更には、糖化剤、糖化剤物などが、適宜選ばれる。

従って、α-グリコシルヘスベリジンの生成を容易にするためには、糖転移酵素系に最適なα-グルコシル糖化合物が選ばれる。

例えば、糖転移酵素として、α-グルコシダーゼ（EC 3.2.1.20）を有する場合には、マルトース、マルトトリオース、マルトテトラオースなどのマルトオリゴ糖、またはD E 約18乃至70の糖部分加水分解物などが好適であり、シクロマルトデキストリン、グルカノトランスフェラーゼ（EC 2.4.1.19）を用いる場合には、シクロアキストリンまたはD E 以下の糖部分加水分解物からD E 約40の糖部分加水分解物などが好適であり、α-アミラーゼ（EC 3.2.1.1）を用いる際には、D E 以下の糖部分加水分解物からD E 約30のデキストリン、糖部分加水分解物などが、好適である。

また、反応時のα-グルコシル糖化合物濃度は、ヘスベリジンに対して約0.5乃至50倍の範囲が、好適である。

反応時のヘスベリジン含有率は、ヘスベリジンとをできるだけ高濃度に含有するものが望ましく、例えば、ヘスベリジン水、懸濁液、または、高濃度で精製された、もしくはpH 7.0を超えるアルカリpHで溶解させた粉状で、ヘスベリジンを高濃度に含有する粉質が高濃度であり、そのヘスベリジンの濃度は約0.005乃至1%以上の高濃度、望ましくは、約0.01乃至10.01%含有している糖液を意味する。

本発明に用いる糖転移酵素は、ヘスベリジンと、この酵素に好適な種類のα-グルコシル糖化合物とを、含有する溶液に作用させると、ヘスベリジンを分解せずにα-グリコシルヘスベリジンを生成するものであればよい。

例えば、α-グルコシダーゼは、ブタの肝臓、ソバの種子などの動物組織由来の酵素、または、ムコール（*Mucor*）属、ペニシリウム（*Penicillium*）属などに属するカビ、または、サッカロミセス（*Saccharomyces*）属などに属する酵母などの微生物を培養媒体で培養し得られる培養物由来の酵素が、シクロマルトデキストリン、グルカノトランスフェラーゼは、バチルス（*Bacillus*）属、クレブシエラ（*Klebsiella*）属などに属する細菌培養物由来の酵素が、α-アミラーゼは、バチルス属などに属する細菌、または、アスペルギルス（*Aspergillus*）属などに属するカビ培養物由来の酵素などが、適宜選択できる。

これらの糖転移酵素は、詳細の条件を満足さえすれば、必ずしも増強して使用する必要はなく、通常は、糖液で本発明の目的を達成することができる。

必要ならば、公知の各種方法で精製して使用してもよい。また、市販の糖転移酵素系を利用することもできる。

使用酵素量と反応時間とは、反応が確保があり、通常は、糖液の濃度から約5乃至60時間で反応を終了するように酵素量が選ばれる。

また、固定化された糖転移酵素をバッチ式で繰り返し、反応に、また、連続式で連続的に反応に利用することも、適宜選択できる。

本発明の反応方法は、ヘスベリジンの仕込濃度を高めた状態で、糖転移酵素を作用させるのが望ましい。

例えば、ヘスベリジンを原料状態で反応せしめる場合には、約0.1乃至0.47/1%の懸濁状ヘスベリジンと過量のα-グルコシル糖化合物とを含有するヘスベリジン高含有液を、pH約4.5乃至5とし、緩衝液が作用しうるできるだけ高温、具体的に、約70乃至90℃に維持し、これに緩衝液を作用させると、ヘスベリジンがα-グリコシルヘスベリジンに変換するにつれて懸濁状ヘスベリジンが徐々に溶解し、同時に、α-グリコシルヘスベリジンが高濃度に変換する。

また、例えば、ヘスベリジンをpH7.4を加えるアルカリ液で反応する場合に於て、pH約7.5乃至10.0の水に約0.2乃至5.0/1%のヘスベリジンを懸濁溶解し、これに過量のα-グルコシル糖化合物を溶解して得られるヘスベリジン高含有液を、緩衝液が作用しうるできるだけ高pH、高温、具体的に、pH約7.5乃至10.0、温度約50乃至80℃に維持し、これに緩衝液を作用せしめるとα-グリコシルヘスベリジンを容易に、高濃度に変換する。

この際、アルカリ性溶液中のヘスベリジンは、分解を起しやすいので、これを防ぐため、できるだけ低温、押気下で処理することが望ましい。必要ならば、シアヌルビン酸、エリソルビン酸などの酸を添加剤を共存させてもよい。

更に、前記条件を組み合わせる方法、例えば、約0.3乃至10.0/1%のヘスベリジンと過量のα-グルコシル糖化合物とを含有するヘスベリジン高含有液をpH約7.5乃至10.0、温度約50乃至80℃に維持し、これに緩衝液を作用させると、α-グリコシルヘスベリジンを容易に、高濃度に変換する。

また、ヘスベリジンとして、例えば、約0.1乃至1.0g/lの安定のカゼイン糖水溶液、カゼイン糖水溶液、炭酸ソーダ水溶液、水酸化カルシウム水、アンモニア水などの弱アルカリ性水溶液に約0.5乃至10.0/1%の高濃度で溶解させたものを用い、これに過量、過剰量の酸性水溶液を加えて、緩衝液が作用しうるpHに調整するとともに、α-グルコシル糖化合物を加え、直ちに緩衝液を作用させることは、α-グリコシルヘスベリジンを容易に、高濃度に変換させることができるので、極めて好都合である。

この際、せっかく高濃度で溶解させたヘスベリジン溶液も、酸性水溶液でpHを調整するとヘスベリジンが析出を起し易いので、そのpH調整時に、α-グル

コシル糖化合物や少量のα-グリコシルヘスベリジンなどを共存させて、ヘスベリジンの析出を抑制しつつ緩衝液反応を開始することも有利に実施できる。

また、更に必要ならば、反応前のヘスベリジンの前処理を高め、ヘスベリジンへの緩衝液反応を容易にするために、ヘスベリジン高含有液に水と互いに溶解しうる有機酸、例えば、メタノール、エタノール、n-プロパノール、i-プロパノール、ニ-ブタノール、アセトール、アトロンなどの低級アルコール、脂肪酸などを共存させることも、適宜選択できる。

また、緩衝液反応により生成せしめた比較的高分子のα-グリコシルヘスベリジンは、必要により、そのままで、または、多孔性合成吸着剤に吸着させた後、グルコアミラーゼ(BC 8.2.1.3)、またはβ-アミラーゼ(BC 8.2.1.2)などのアミラーゼによって過剰な水分を分解し、α-グリコシルヘスベリジンのα-グルコシル基の数を低減させることができる。例えば、グルコアミラーゼを作用させる場合には、α-マルトシルヘスベリジン以上の高分子物を加水分解し、グルコースを生成するとともにα-グルコシルヘスベリジンを容易に生成させることができる。また、β-アミラーゼを作用させる場合には、α-マルトリオシルヘスベリジン以上の高分子物を加水分解し、マルトースを生成するとともに、主にα-グルコシルヘスベリジンとα-マルトシルヘスベリジンとの混合物を、容易に生成させることができる。

前述のようにしてα-グリコシルヘスベリジンを生成せしめた反応液は、そのままα-グリコシルヘスベリジン製品にすることもできる。通常は、反応液を濃縮、蒸留してシラップ状の、または、乾燥、粉末化して粉末状のα-グリコシルヘスベリジン製品にする。

本製品は、ビタミンD強化剤としてばかりでなく、安全性の高い大粒型の黄色着色料、酸化防止剤、安定剤、防腐剤、香料、紫外線吸収剤などとして、軟食料、嗜好物、飼料、餌料、医薬品、化粧品、プラスチック製剤など、各種組成物への用途に、有利に利用される。

更に、精製されたα-グリコシルヘスベリジン製品を製造する場合には、多孔性合成吸着剤による吸着性の差を利用してα-グリコシルヘスベリジンとα-グルコシル糖化合物などの不純物とを分離して精製すればよい。

本発明という多孔性合成吸着剤とは、多孔性に広い吸着表面積を有し、かつ野イオン性のスチレン-ビニルベンゼン系共重合体、フェノール-ホルマリン樹脂、アクリレート樹脂、メタアクリレート樹脂などの合成樹脂であり、例えば、市販されているRohm & Haas社製の商品名アンバーライトXAD-1、アンバーライトXAD-2、アンバーライトXAD-4、アンバーライトXAD-7、アンバーライトXAD-8、アンバーライトXAD-11、アンバーライトXAD-12、三井化成工業株式会社製の商品名ダイアイオンHP-30、ダイアイオンHP-40、ダイアイオンHP-50、ダイアイオンHP-40、ダイアイオンHP-30、IHCAT社製の商品名イマクティオン-42、イマクティオン-44、イマクティオン-48などがある。

本発明のα-グリコシルヘスベリジンを生成せしめた反応液の精製方法は、反応液を、例えば、多孔性合成吸着剤を充填したカラムに通過すると、α-グリコシルヘスベリジンおよび比較的小量の未反応ヘスベリジンが多孔性合成吸着剤に吸着するのに対し、多量に共存するα-グルコシル糖化合物、水溶性物質は吸着されず、そのまま流出する。

必要ならば、緩衝液の反応終了後、多孔性合成吸着剤に接触させるまでの間に、例えば、反応液を加熱して生じる不溶物を除去して除去したり、ケイ酸アルミン酸マグネシウム、アルミン酸マグネシウムなどで処理して反応液中の蛋白質などを吸着除去したり、陰性野イオン交換樹脂(H型)、中塩基性または弱塩基性イオン交換樹脂(OH型)などで処理して脱塩するなどの精製方法を実施して、利用することも望ましい。

前述のようにして、多孔性合成吸着剤カラムに選択的に吸着したα-グリコシルヘスベリジンと比較的小量の未反応ヘスベリジンとは、蒸留水、水などで洗淨した後、比較的小量の有機溶媒または有機酸と水との混合液、例えば、メタノール水、エタノール水などを通過すれば、まず、α-グリコシルヘスベリジンが溶出し、濃縮液を増すか有機溶媒濃度を高めるかすば未反応ヘスベリジンが溶出してくる。

このα-グリコシルヘスベリジン高含有液を出液を高濃度処理して、まず有機溶媒を除去した後、適当な濃度まで濃縮すればα-グリコシルヘスベリジンを

主成分とするシラップ状製品が得られる。更に、これを乾燥して粉末化することによって、α-グリコシルヘスベリジンを主成分とする粉末状製品が得られる。

この精製過程によるα-グリコシルヘスベリジンおよび未反応ヘスベリジンの抽出操作は、同時に、多孔性合成吸着剤の再生操作にもなるので、この多孔性合成吸着剤の繰り返し使用を可能にする。

また、本発明の多孔性合成吸着剤による精製は、α-グルコシル糖化合物、水溶性物質だけでなく、水溶性の糖類などの不純物も同時に除去できる特徴を有している。このようにして得られるα-グリコシルヘスベリジンは、次の特徴を有している。

- (1) ヘスベリジンと比較してα-グリコシルヘスベリジンは、水溶性が極めて大きい。また、α-グリコシルヘスベリジンは、ヘスベリジン含有が乾燥前のヘスベリジンの析出を抑制し、乾燥後の白濁を防止する。このことから、α-グリコシルヘスベリジンは、相溶懸濁液に含まれるヘスベリジンの析出を抑制し、白濁を防止することのできる安定剤として有利に利用できる。
- (2) ヘスベリジンと比較してα-グリコシルヘスベリジンは、耐光性、安定性が大きい。
- (3) α-グリコシルヘスベリジンは、飼料の原料によりヘスベリジンとグルコースとに加水分解され、ヘスベリジン本来の生理活性(ビタミンD)を示す。また、α-グリコシルヘスベリジンは、ビタミンD、リボフラビン、ビタミンC、ビタミンEなど他のビタミンや酸化防止剤の場合とは違って、実質的に無味、無臭であって、黄色、褐色、濁液発生などの副作用もなく安心して利用でき、α-グリコシルヘスベリジンを、ビタミンや酸化防止剤の1種または2種以上と併用することも好都合である。また、ビタミンCとの併用により、それらの持つ生理活性を増強させることができる。
- (4) α-グルコシル糖化合物を含有する製品の場合には、α-グリコシルヘスベリジンの効果を増強するのみならず、α-グルコシル糖化合物が腸胃、増進効果や、甘味効果を増強することができる。また、α-グルコシル糖化合物を除去した精製製品の場合には、ほとんど無味、増進することなくα-グ



件した α-グルコシル ヘスベリジン (別名、ヘスベリジンモノグルコサイド) と判別され、製品「I」および製品「II」に含まれる 870.34 を示す物質は、ヘスベリジン1モルに D-グルコースが2モルを結合した α-グルコシル ヘスベリジン (別名、ヘスベリジンジグルコサイド) と判断され、併せて、製品「I」に含まれる 870.22 以下の複数のスポットを示す物質は、ヘスベリジン1モルに D-グルコース残基が3モル以上 α 結合した α-オリゴグルコシル ヘスベリジンであると判断される。

このように、本発明の α-グリコシル ヘスベリジンは、ヘスベリジンに D-グルコース残基が特セル状に α 結合した水溶性且高純度の新規ヘスベリジン糖誘導体であって、生体内に吸収されると、α-グルコシダーゼによって容易に加水分解され、ヘスベリジン本来の生体活性を發揮する。

#### 実験 3 急性毒性

7月令の雄系マウスを使用して、実験 1 (2) の方法で調製した α-グリコシル ヘスベリジン製品「I」を経口投与して、急性毒性テストをしたところ、体重 1kg 当たり、5g まで死亡例は認められなかった。従って、本試薬の毒性は極めて低い。なお、実験 1 (3) の方法で調製した α-グリコシル ヘスベリジン製品「II」を用いて同様に本テストを行ったところ、前述と同様の結果が得られ、毒性が極めて低いことが、判明した。

以下、本発明の実施例として、α-グリコシル ヘスベリジンの製造例を実施例 A で、α-グリコシル ヘスベリジンの各種組成物への用途例を実施例 B で述べる。

#### 実施例 A-1 α-グリコシル ヘスベリジン

ヘスベリジン1重量部を100重量部セリソグ酸塩(重量部で溶解し、これに 0.1 規定塩酸溶液を加えて中和するとともにデキストリン (DE 105 4 重量部) を加え、直ちにバナルス・ステアロソロー・セフォルス肉製のシクロマルトデキストリン グルカノトランスフェラーゼ (株式会社神田生物化学研究所製造) をデキストリングラム当たり 20 単位に加え、pH 8.0、75℃に維持して、攪拌しつつ24時間反応させた。反応液を降膜クロマトグラフィーで分離したところ、ヘスベリジンの約 70% が、α-グルコシル ヘスベリジン、α-オリゴグルコシル ヘスベリ

ジン、α-トリグルコシルヘスベリジン、α-テトラグルコシル ヘスベリジン、α-ペンタグルコシル ヘスベリジンなどの α-グリコシル ヘスベリジンに含有していた。反応液を加熱して水を蒸発させ、濃縮し、濃縮液を、常速に乾して、イオン交換樹脂 (II 型および OI 型) で脱塩精製し、乾燥して、シラップ状の α-グルコシル糖化合物を含有する α-グリコシル ヘスベリジン製品を得た。乾燥物当り原料重量に対して約 93% の収率で得た。

本品は、ビタミンP強化剤としてばかりでなく、安全性の高い天然型の黄色着色剤、酸化防止剤、安定剤、品質改良剤、予防剤、治療剤、雪外融雪剤などとして、飲食物、嗜好物、飼料、飼料、抗感受性医薬用、化粧品、プラスチック製品など、各種組成物への用途に容易に利用できる。

#### 実施例 A-2 α-グルコシル ヘスベリジン

実施例 A-1 の方法に準じて調製したシラップ状の α-グルコシル糖化合物を含有する α-グリコシル ヘスベリジン製品1重量部を水4重量部に溶解し、これにグルコアミラーゼ (EC 3.2.1.8、生化学工業株式会社販売) を α-グリコシル ヘスベリジン製品1重量部当り 100 単位に加え、50℃、5 時間反応させた。反応液を降膜クロマトグラフィーで分析したところ、α-グリコシル ヘスベリジンは、α-グルコシル ヘスベリジンに転換していた。

反応液を加熱して水を蒸発させ、濃縮し、濃縮液を多孔性合成膜濾過器、同品名ダイキオン SP-10 (三亜化成工業株式会社販売) のカラムに S V1 で通液した。その結果、溶液中の α-グルコシル ヘスベリジンと未反応ヘスベリジンとが多孔性合成膜濾過器に吸着し、グルコース、糖類などは吸着することなく流出した。次いで、カラムを水で洗浄、洗浄した後、エタノールを溶媒濃度を段階的に高めながら通液し、α-グルコシル ヘスベリジン成分を採取し、減圧濃縮し、乾燥して、粉末状の α-グルコシル ヘスベリジンを得た。乾燥物当り原料のヘスベリジン重量に対して約 80% の収率で得た。

α-グルコシル ヘスベリジン粉末を加水分解したところ、ヘスベリジン1モルに対し、1-ラムノース1モル、D-グルコース2モルを生成し、また、α-グルコシル ヘスベリジンに、ブタの肝臓から抽出し乾燥した α-グルコシダーゼを作用させると、ヘスベリジンと D-グルコースとに加水分解される

ことが判明した。

本 α-グルコシル ヘスベリジンは、高度に精製された水溶性の高いビタミンP強化剤として、また、着色着色剤、酸化防止剤、安定剤、品質改良剤、予防剤、治療剤、雪外融雪剤などとして、飲食物、嗜好物、抗感受性医薬用、化粧品など、各種組成物への用途に、有効に利用できる。

#### 実施例 A-3 α-グリコシル ヘスベリジン

ヘスベリジン1重量部を水500重量部に pH 9.5 で加熱溶解し、別にデキストリン (DE 8) 10 重量部を水10重量部に加熱溶解し、次いで、これら溶液を混合し、これにシクロマルトデキストリン グルカノトランスフェラーゼを、デキストリングラム当り 30 単位に加え、pH 8.2、65℃に維持して、攪拌しつつ40時間反応させた。

反応液を降膜クロマトグラフィーで分析したところ、ヘスベリジンの約 80% が α-グリコシル ヘスベリジンに転換していた。

反応液を加熱して水を蒸発させた後、濃縮し、濃縮液を多孔性合成膜濾過器、商品名アンバーライト XA-10-7 (Rohm & Haas 社製造) のカラムに S V1.5 で濃縮した。

その結果、溶液中の α-グリコシル ヘスベリジンと未反応ヘスベリジンとが多孔性合成膜濾過器に吸着し、デキストリン、オリゴ糖、糖類などは吸着することなく流出した。

このカラムを水で洗浄、洗浄した後、50%メタノールを溶媒として、α-グルコシル ヘスベリジンおよびヘスベリジンを出し、これを濃縮し、粉末化して、粉末状 α-グルコシル ヘスベリジン製品を原料のヘスベリジン重量に対して約 82% の収率で得た。

本品は、本発明の黄色いビタミンP強化剤としてばかりでなく、安全性の高い天然型の黄色着色剤、酸化防止剤、安定剤、品質改良剤、予防剤、治療剤、雪外融雪剤などとして、飲食物、嗜好物、飼料、飼料、抗感受性医薬用、化粧品、プラスチック製品など、各種組成物への用途に容易に利用できる。

#### 実施例 A-4 α-グリコシル ヘスベリジン

(1) α-グルコシダーゼ製品の調製

マルトース 47.7%、リン酸カリウム 0.1%、硝酸アンモニウム 0.1%、硝酸マグネシウム 0.05%、塩化カリウム 0.05%、ポリペプトン 0.2%、炭酸カルシウム 1% (これに、必要減量して、投薬時には無菌的に添加する。) および水からなる液体培地 500 重量部に、ムコール・ジャパニカス (Nacor Japnica) : F O 4570 を 10℃で、44 時間振盪培養した。培養終了後、菌液を採取し、その菌液を 4 重量部に、0.5M 酢酸緩衝液 (pH 5.5) に溶解した 4M 尿素液 500 重量部を加え、50℃で 40 時間静置した液、過り分離した。この上清を流水中で一度透析した後、真空 0.05 気圧とし、4℃で一晩放置して沉淀した低分子量成分を採取し、0.01M 酢酸緩衝液 (pH 5.5) 50 重量部に稀薄溶解した後、遠心分離して上清を採取し、α-グルコシダーゼ溶液とした。

#### (2) α-グリコシル ヘスベリジンの調製

ヘスベリジン3重量部を0.5規定セリソグ酸塩100重量部に加熱溶解し、これに0.01規定塩酸溶液を加えて pH 9.5 にするとともに、デキストリン (DE 32) 20 重量部を加え、直ちに(1)の方法で調製した α-グルコシダーゼ培地 10 重量部を加え、pH 8.5 に維持して攪拌しつつ55℃で48時間反応させた。

反応液を降膜クロマトグラフィーで分析したところ、ヘスベリジン約 80% が α-グリコシル ヘスベリジンに転換していた。

反応液を実施例 A-3 と同様に濃縮し、乾燥、粉末化して粉末状 α-グリコシル ヘスベリジン製品を原料のヘスベリジン重量に対して約 81% の収率で得た。

本品は、実施例 A-3 の場合と同様に、水溶性の高いビタミンP強化剤としてばかりでなく、安全性の高い天然型の黄色着色剤、酸化防止剤、安定剤、品質改良剤、予防剤、治療剤、雪外融雪剤などとして、各種組成物への用途に利用できる。

#### 実施例 B-1 ハードキャンディ

還元芽芽糖水飴 (林原南興株式会社販売、登録商標マビット) 1,500 重量部を加えて、減圧下で水分約 2% 以下になるまで濃縮し、これにラエン酸 15 重量部および実施例 A-4 の方法で得た粉末状 α-グリコシル ヘスベリジン1重

魚肝油および少量のレモン香料を調和し、次いで溶媒に溶けて、成形、包装してハードキャンディーを得た。

本品は、ビタミンPを強化した黄色のレモンキャンディーであって、含む特性、低カロリーである。

#### 実施例 B-2 フキの水蜜

フキを皮むきし、薄切に長さ10mmにして、深い煮沸水に数時間浸し、これを実施例A-1の方法で得たシロップはα-グリコシル ヘスペリジンと黄色1号とを配合して調整した黄色着色料を含む溶液で染み込んで、着色の暗かなフキの水蜜を得た。

本品は、各種の風味料の材料として色どりを添えるとともに、食物繊維としての生理効果をも発揮する。

#### 実施例 B-3 氷 菓

モチ降糖粉1重量部を水1.2重量部を配合し、加熱溶化しつつ、これに砂糖1.5重量部、結晶性β-マルトース（結晶性50%純品、砂糖当量サンマルト）0.7重量部、水飴0.3重量部および実施例A-1の方法で得たシロップ状α-グリコシル ヘスペリジン0.2重量部を添加し、以後、前法に従って、成形、包装して氷菓を製造した。

本品は、風味、口当たりとも良好な氷菓で、きびだんご風の和菓子である。

#### 実施例 B-4 混合甘味料

はちみつ100重量部、異性化糖50重量部、亜砂糖5重量部および実施例A-4の方法で得た粉状α-グリコシル ヘスペリジン1重量部を混合して配合甘味料を得た。

本品はビタミンPを強化した甘味料で健康食品として好適である。

#### 実施例 B-5 サンドクリーム

結晶性α-マルトース（非原料株式会社製造、登録商標ファイントース）1、200重量部、ショートニング1,000重量部、実施例A-3の方法で得た粉状α-グリコシル ヘスペリジン10重量部、レシチン1重量部、レモンオイル1重量部、バニラオイル1重量部を皆仕により混和してサンドクリームを製造した。

本品は、ビタミンP強化、黄色着色したサンドクリームで、口当たり、風味とも良好である。

#### 実施例 B-6 錠 剤

アスコルビン酸20重量部に結晶性β-マルトース10重量部、コーンスターチ1重量部および実施例A-2の方法で得た粉状α-グリコシル ヘスペリジン5重量部を均一に混合した後、既知12mm、20R粒を用いて、打錠し錠剤を得た。

本品は、アスコルビン酸とα-グリコシル ヘスペリジンの複合ビタミン剤で、アスコルビン酸の安定性もよく、飲み易い錠剤である。

#### 実施例 B-7 カプセル剤

酢酸カルシウム・三水塩10重量部、L-乳酸マグネシウム・三水塩50重量部、マルトース57重量部、実施例A-2の方法で得たα-グリコシル ヘスペリジン70重量部及びβ-ニコチン酸205含有アスコロドキシトリン含有化合物12重量部を均一に混合し、顆粒成形機にかけて顆粒とした後、再度に乾く、ピラジナカプセルに封入して、一カプセル150mg入のカプセル剤を製造した。

本品は、血中コレステロール低下薬、免疫賦活剤、整腸剤などとして、感受性疾患の予防剤、治療剤、補食増進用食品などとして有利に利用できる。

#### 実施例 B-8 飲 食

酢酸ナトリウム・三水塩1重量部、DL-乳酸カルシウム4重量部をグリセリン10重量部と均一に混合し、この混合液を、ウセリン40重量部、ホロウ10重量部、ラノリン10重量部、ゴマ油14.5重量部、実施例A-4の方法で得たα-グリコシル ヘスペリジン1重量部及びハッカ油0.5重量部の混合液に加入し、更に均一に混和して軟膏を製造した。

本品は、日焼け止め、焼肌膏、色白剤などとして、更には外傷、火傷の治療薬塗料などとして、有利に利用できる。

#### 実施例 B-9 注 射 剤

実施例A-2の方法で得たα-グリコシル ヘスペリジンを水に溶解し、常法に従って、特製滅菌してバイロゲンフリーとし、この溶液を20ml容アン

ブルドα-グリコシル ヘスペリジンが50mgになるように分注し、これを滅菌乾燥し、封入して注射剤を製造した。

本注射剤は、単体で、または、他のビタミン、ミネラルなどと混合して筋肉内又は静脈内に投与できる。また、本品は、低温貯蔵の必要もなく、使用に際しては生理用塩水などへの希釈性に極めて良好である。

#### 実施例 B-10 注 射 剤

塩化ナトリウム6重量部、塩化カリウム8.5重量部、塩化カルシウム0.2重量部、乳酸ナトリウム3.1重量部、マルトース45重量部及び実施例A-2の方法で得たα-グリコシル ヘスペリジン10重量部を水1,000重量部に溶解し、常法に従って、特製滅菌してバイロゲンフリーとし、この溶液を滅菌したプラスチック容器に20mlずつ充填して、注射剤を製造した。

本品は、ビタミンP補給としてだけでなく、カロリー補給、ミネラル補給のための材料で、病中、病後の治療薬、回復薬などに有利に利用できる。

#### 実施例 B-11 腸管用投剤

結晶性α-マルトース20重量部、グリシン1.1重量部、グルタミン酸ナトリウム0.18重量部、玄米1.2重量部、クエン酸1重量部、乳酸カルシウム0.4重量部、炭酸マグネシウム0.1重量部、実施例A-3の方法で得たα-グリコシル ヘスペリジン0.1重量部、チアミン0.31重量部及びポリボラビン0.41重量部からなる配合物を調製する。この配合物24gずつをラミネートアルミ製小袋に充填し、ヒートシールして投与型腸剤を製造した。

本投与型腸剤は、一回約300乃至500mlの水に溶解し、経口方法により鼻腔、胃、腸などへの腸口投与又は経口投与投与投与としても有利に利用できる。

#### 実施例 B-12 新 用 剤

DL-乳酸ナトリウム21重量部、ビルビン酸ナトリウム8重量部、実施例A-1の方法で得たα-グリコシル ヘスペリジン5重量部及びエタノール40重量部、精製水28重量部及び着色料、香料の適量と混合し、新用剤を製造した。

本品は、整腸剤、色白剤として好適であり、人浴用の湯に10乃至15,000ppmに希釈して利用すればよい。本品は、入浴用の湯の場合と同様に、洗眼用水、化粧水などに希釈して利用することも、有利に利用できる。

#### 実施例 B-13 乳 液

ポリオキシエチレンパヘニルエーテル0.5重量部、テトラオレイン酸オレオキシエチレンソルビトール1重量部、硬脂酸モノステアリン酸グリセリン3重量部、ビルビン酸0.5重量部、パヘニルアルコール0.5重量部、アボガド油1重量部、実施例A-3の方法で得たα-グリコシル ヘスペリジン1重量部、ビタミンE及び防腐剤の適量と、常法に従って加熱精製し、これにL-乳酸ナトリウム1重量部、1.3-ブチレンジリコール5重量部、カルボキシビニルポリマー1.1重量部及び精製水85.3重量部を加え、ホモゲナイザーにかけ乳化し、更に香料の適量を加えて調剤混合し、乳剤を製造した。

本品は、日焼け止め、整腸剤、色白剤などとして、有利に利用できる。

#### 実施例 B-14 クリーム

モノステアリン酸オレオキシエチレンジリコール2重量部、自己乳化型モノステアリン酸グリセリン5重量部、実施例A-2の方法で得たα-グリコシル ヘスペリジン2重量部、硬脂酸パラフィン3重量部、トリオクタン酸グリセリン1重量部及び防腐剤の適量と、常法に従って加熱精製し、これにL-乳酸2重量部、1.3-ブチレンジリコール5重量部及び精製水66重量部を加え、ホモゲナイザーにかけ乳化し、更に香料の適量を加えて調剤混合クリームを製造した。

本品は、日焼け止め、整腸剤、色白剤などとして有利に利用できる。

#### 【発明の効果】

本発明で述べたごとく、本発明の新規特許であるヘスペリジンにα-グルコース残基が等モル以下を結合しているα-グリコシル ヘスペリジンは、水溶性に優れた、実質的に無味、無臭で、毒性の懸念もなく、生体内で容易にヘスペリジンとα-グルコースとに加水分解され、ヘスペリジン本来の生理活性を発揮する。

また、このα-グリコシル ヘスペリジンが、ヘスペリジンとα-グルコシル糖化合物とを含む溶液に、機能性成分を添加させた水溶性の手段により、希

易に生成できることから、経済性に優れ、その下処理も容易である。

更に、ヘスペリジンの反応速度を高めることができ、 $\alpha$ -グリコシル ヘスペリジンの量を、容易に高濃度に生成しうることを見出し、併せて、この反応速度の制御に際して、反応速度を多量に促進剤と接触させて $\alpha$ -グリコシル ヘスペリジンを生成することも見出したことにより、 $\alpha$ -グリコシル ヘスペリジンの大量製造を、極めて容易にするものである。

また、このようにして得られる $\alpha$ -グリコシル ヘスペリジンは、水溶性良好、耐光性・安定性良好、十分な生体活性を発揮するなどの特徴を有しており、安全性の高い天然型のビタミンD強化剤としてばかりでなく、黄色着色剤、脂溶性色素、安定剤、滋養増進剤、予肥剤、治療剤、紫外線吸収剤、省化防止剤などとして、軟膏剤、増感剤、染料、飼料、洗滌剤、医薬品、化粧品、漂白剤などの化粧品、更に、プラスチック製品など、各種組成物への用途に有利に利用される。

よって、本発明による $\alpha$ -グリコシル ヘスペリジンの工業的製造法と、その用途の範囲は、軟食品、化粧品、医薬品、プラスチック産業における工業的製法が極めて大きい。

#### 4. 図面の簡単な説明

第1図は、本発明の一例として、 $\alpha$ -グリコシル ヘスペリジン標品[1]の紫外線吸収スペクトルを示す。

第2図は、本発明の一例として、 $\alpha$ -グリコシル ヘスペリジン標品[1]の紫外線吸収スペクトルを示す。

特許出願人

株式会社林産物化学研究所

代表者 林 達 雄

